

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 07-231793

(43)Date of publication of application : 05.09.1995

(51)Int.Cl.

C12P 19/32  
 //(C12P 19/32  
 C12R 1:185 )  
 (C12P 19/32  
 C12R 1:425 )  
 (C12P 19/32  
 C12R 1:22 )  
 (C12P 19/32  
 C12R 1:01 )

(21)Application number : 06-315996

(71)Applicant : AJINOMOTO CO INC

(22)Date of filing : 28.11.1994

(72)Inventor : YAMADA HIDEAKI  
 ASANO YASUHISA  
 MIHARA YASUHIRO  
 UDAGAWA TAKASHI

(30)Priority

Priority number : 05348842 Priority date : 27.12.1993 Priority country : JP

## (54) PRODUCTION OF NUCLEOSIDE-5'-PHOSPHORIC ACID ESTER

(57)Abstract:

PURPOSE: To provide a method for stably and efficiently producing a nucleoside-5'-phosphoric acid ester without accompanying production of isomer by-product by using a microorganism.

CONSTITUTION: A microorganism belonging to the genus Enterobacter, Escherichia, Morganella, Klebsiella, Serratia, Chromobacterium or Cedecea and having ability producing a nucleoside-5'-phosphoric acid ester from a nucleoside and a phosphoric acid donor selected from a group consisting of a polyphosphoric acid (salt), a phenylphosphoric acid (salt) and a carbamylphosphoric acid (salt) is reacted with the nucleoside and the phosphoric acid donor selected from a group consisting of the polyphosphoric acid (salt) and the phenyl phosphoric acid (salt) and the carbamylphosphoric acid (salt) at pH4.0-6.5 and the produced nucleoside-5'-phosphoric acid ester is collected.

\* NOTICES \*

JPO and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.

2.\*\*\*\* shows the word which can not be translated.

3.In the drawings, any words are not translated.

CLAIMS

[Claim(s)]

[Claim 1]Enterobacter, Escherichia, Morganella, Klebsiella, Belong to Serratia, Chromobacterium, or a SEDESHIA group, and A nucleoside and polyphosphoric acid (salt), A microorganism which has the capability to generate nucleoside 5'-phosphoric ester from a phosphate donor chosen from a group which consists of phenyl phosphoric acid (salt) and carbamyl phosphate (salt), Under conditions of pH 4.0-6.5, a nucleoside and polyphosphoric acid (salt), A manufacturing method of nucleoside 5'-phosphoric ester making it act on a phosphate donor chosen from a group which consists of phenyl phosphoric acid (salt) and carbamyl phosphate (salt), making nucleoside 5'-phosphoric ester generate, and extracting this.

[Translation done.]

\* NOTICES \*

JPO and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.\*\*\*\* shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

DETAILED DESCRIPTION

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Industrial Application]This invention relates to the manufacturing method of nucleoside 5'-phosphoric ester. Nucleoside 5'-phosphoric ester is useful as a seasoning, medicines, and those raw materials.

[0002]

[Description of the Prior Art]As a biochemical manufacturing method of nucleoside 5'-phosphoric ester, How to phosphorylate a nucleoside, using a p nitrophenyl phosphate as a phosphate donor (JP,39-29858,B), The method (JP,42-1186,B) of using inorganic phosphoric acid, the method (JP,56-82098,A) of using acetyl phosphate, and the method (JP,63-230094,A) of using adenosine triphosphate (ATP) are known. This invention persons are developing the method of using polyphosphoric acid (JP,53-56390,A).

[0003]

[Problem(s) to be Solved by the Invention]However, it was expensive [ which is used if it is in these methods ], or unstable, and it was disadvantageous in order to produce stable nucleoside 5'-phosphoric ester. It became clear that the byproduction not only of nucleoside 5'-phosphoric ester but the 2'-3'-nucleotide isomer was carried out also for the method of using the polyphosphoric acid which this invention persons have developed, as an output as a result of a subsequent detailed examination, and it became clear for it to be difficult for presenting practical use.

[0004]

[Means for Solving the Problem]Then, a result of having added various examination in order that this invention person might produce stable nucleoside 5'-phosphoric ester, By making a microorganism specific under weak acidic conditions (pH 4.0-6.5) act on a phosphate donor chosen from a group which consists of a nucleoside and polyphosphoric acid (salt), phenyl phosphoric acid (salt), and carbamyl phosphate (salt), Without being accompanied by a byproduction of 2'- and 3'-nucleotide, what can produce nucleoside 5'-phosphoric ester is discovered efficiently, and it came to complete this invention.

[0005]This invention Namely, Enterobacter, Escherichia, Morganella, It belongs to Klebsiella, Serratia, Chromobacterium, or a SEDESHIA group, A microorganism which has the capability to generate nucleoside 5'-phosphoric ester from a phosphate donor chosen from a group which consists of a nucleoside and polyphosphoric acid (salt), phenyl phosphoric acid (salt), and carbamyl phosphate (salt), Under conditions of pH 4.0-6.5, a nucleoside and polyphosphoric acid (salt), Make it act on a phosphate donor chosen from a group which consists of phenyl phosphoric acid (salt) and carbamyl phosphate (salt), nucleoside 5'-phosphoric ester is made to generate, and a manufacturing method of nucleoside 5'-phosphoric ester extracting this is provided.

[0006]

[Function]In this invention, the microorganism used Enterobacter, Escherichia, It belongs to Morganella, Klebsiella, Serratia, Chromobacterium, or a SEDESHIA group, It is a microorganism which has the capability to generate nucleoside 5'-phosphoric ester from the phosphate donor chosen from the group which consists of a nucleoside and polyphosphoric acid (salt), phenyl phosphoric acid (salt), and carbamyl phosphate (salt).

For example, the following microorganisms are used.

[0007]

*Escherichia blattae* JCM 1650 *Serratia ficaria* ATCC 33105 *Klebsiella planticola* IFO 14939 (ATCC 33531) *Klebsiella pneumoniae* IFO 3318 (ATCC 8724) *Klebsiella terrigena* IFO 14941 (ATCC 33257) *Morganella morganii* IFO 3168 *Enterobacter aerogenes* IFO 12010 *Enterobacter aerogenes* IFO 13534 (ATCC 13048) *Chromobacterium fluviatile* IAM 13652 *Chromobacterium violaceum* IFO 12614 *Cedecea lapagei* JCM 1684 *Cedecea davisiae* JCM 1685 *Cedecea neteri* JCM 5909 [0008] The above-mentioned microorganism is cultivated in the usual nutrient medium containing a carbon source, a nitrogen source, inorganic ion, etc. As a carbon source, alcohols, such as organic acid, such as citrate, boletic acid, gluconic acid, etc. besides sugars, such as glucose, fructose, sucrose, and malt sugar, ethanol, and glycerin, are used. As a nitrogen source, ammonium salt, such as ammonium chloride, ammonium sulfate, and ammonium nitrate, an ammonia solution, and ammonia gas are preferred. As inorganic ion, ferrous ion, magnesium ion, manganese ion, a phosphate anion, and potassium ion are added if needed, for example. Sources of organotrophic, such as yeast extracts containing these, such as amino acid and a vitamin, peptone, a meat extract, corn steep liquor, and soybean protein hydrolyzate, are added if needed.

[0009] Culture of the above-mentioned microorganism is performed by a conventional method. For example, what is necessary is to set pH of a culture medium to 5-8, and just to cultivate aerobically at 20-40 °C after inoculating a microorganism for 5 to 72 hours.

[0010] As a method of making the above-mentioned microorganism acting on the phosphate donor chosen from the group which consists of a nucleoside and polyphosphoric acid (salt), phenyl phosphoric acid (salt), and carbamyl phosphate (salt), and obtaining nucleoside 5'-phosphoric ester, The microbial cell separated from the culture medium obtained in this way and culture medium, its dried cell, What is necessary is just to contact the phosphate donor chosen from the group which consists of a nucleoside, polyphosphoric acid (salt) and phenyl phosphoric acid (salt), and carbamyl phosphate (salt) in an aqueous medium in biomass treatment objects, such as biomass debris or its autolysate. Under the present circumstances, it is required to adjust pH of a reaction to the acescence of the range of 4.0-6.5.

[0011] As polyphosphoric acid (salt) used as a phosphate donor, Pyrophosphoric acid, Tripoli phosphoric acid, Tori metaphosphoric acid, tetrametaphosphoric acid, hexametaphosphoric acid, Or those mixtures or those sodium salt, potassium salt, or those salt mixtures as phenyl phosphoric acid (salt), Phenyl phosphoric acid disodium, phenyl phosphoric acid JIKARIUMU, O,O-diphenylphosphoric anhydrides, or those mixtures as carbamyl phosphate (salt), It is usable in carbamyl phosphate disodium, carbamyl phosphate JIKARIUMU, carbamyl phosphate dianmonium, carbamyl phosphate dilithium, or those mixtures. The operating concentration of a phosphate donor is determined by the concentration of the nucleoside which is a phosphate acceptor. Usually, 1-5-times the amount addition of a nucleoside is desirable.

[0012] As a nucleoside to be used, a uridine, cytosine, etc. are mentioned as pyrimidine nucleosides, such as a pudding riboside, inosine, guanosine, adenosine, and xanthosine, as purine nucleosides. Corresponding to the nucleoside to be used, 5'-pudding ribotide, 5'-inosinic acid, 5'-guanylic acid, 5'-adenylic acid, 5'-xanthylic acid, 5'-uridylic acid, 5'-cytidylic acid, etc. generate.

[0013] As concentration of the nucleoside added to reaction mixture, although 0.1-10g / dL is desirable, when using a poorly soluble nucleoside for water, it is good to add dissolution auxiliary agents, such as boric acid or dimethylsulfo-oxide.

[0014] the reaction of the temperature of 20-60 °C is usually 30-40 °C desirably --- pH 4.0-6.5 --- the acescence side of pH 4.5-6.0 gives a good result desirably. Conventionally, pH in the production method of the nucleoside 5'-phosphoric ester reported is a different range, and this suitable pH range has the feature of this invention also in this point.

[0015] Any method of still standing or stirring can be adopted as a reaction. Although reaction time changes with conditions, such as the activity of the microorganism to be used, and concentration of a substrate, its 1 to 100 hours are desirable.

[0016] The way separation of the nucleoside 5'-phosphoric ester generated in reaction mixture uses usual ion-exchange resin, and the separation method performed to usual [ other ] are used.

[0017]

[Example] Hereafter, the example of this invention is described in detail. In this example, the nucleoside of a raw material and the generated nucleoside 5'-phosphoric ester, By high-speed fluid column chromatography (HPLC, High Performance Liquid Chromatography), it analyzed under the following apparatus and a condition.

Column: KOSUMOJIRU 5C<sub>18</sub>-AR (4.6x150 mm) [Nacalai Tesque, Inc. products]

moving-bed: -- 5 mM Potassium phosphate: (pH 2.8) Methanol = 95:5 rate-of-flow: -- a part for 1.0 mL/-- temperature: -- room temperature detection: -- UV 245nm [0018] (Example 1) The nutrient medium (pH 7.0) containing peptone 1 g/dL, yeast extract 0.5 g/dL, and salt 1 g/dL was put into the 500-ml Sakaguchi flask 50 mL, and it heat-sterilized at 120 \*\* for 20 minutes. The microorganism shown in Table 1 which carried out slant culture to this was inoculated, and it cultivated at 30 \*\* for 16 hours. From the culture medium obtained in this way, by centrifugal separation, biomasses were collected, the biomass was suspended to acetic acid buffer liquid (pH 5.0), and biomass suspension was prepared.

[0019] It was made to react at 30 \*\* for 5 hours, adjusting and maintaining [ dissolve inosine 2 g/dL, pyrophosphoric acid 10 g/dL, and MgSO<sub>4</sub> 2mM in acetic acid buffer liquid, add so that it may become 5 g/dL with biomass wet weight about the above-mentioned biomass suspension at this, and ] pH to 5.0. The generated amount of 5'-inosinic acid was shown in Table 1. Most byproductions of 2'-inosinic acid and 3'-inosinic acid were not accepted about which strain, either.

[0020]

[Table 1]

菌 株	イノシン酸生成量 mg/dl
<i>Escherichia blattae</i> JCM 1650	304
<i>Serratia ficaria</i> ATCC 33105	153
<i>Klebsiella planticola</i> IFO 14939	412
<i>Klebsiella pneumoniae</i> IFO 3318	361
<i>Klebsiella terrigena</i> IFO 14941	167
<i>Morganella morganii</i> IFO 3168	190
<i>Enterobacter aerogenes</i> IFO 12010	211
<i>Enterobacter aerogenes</i> IFO 13534	219
<i>Chromobacterium fluvitile</i> IAM 13652	150
<i>Cedecea lapagei</i> JCM 1684	165

[0021] (Example 2) It replaced with the inosine in reaction mixture using the strain prepared in Example 1, and reacted similarly using guanosine. Generated 5'-guanyl acidity was shown in Table 2.

[0022]

[Table 2]

菌 株	グアニル酸生成量 mg/dl
<i>Escherichia blattae</i> JCM 1650	203
<i>Serratia ficaria</i> ATCC 33105	120
<i>Klebsiella pneumoniae</i> IFO 3318	222
<i>Morganella morganii</i> IFO 3168	176
<i>Enterobacter aerogenes</i> IFO 12010	109
<i>Chromobacterium fluvitile</i> IAM 13652	110
<i>Cedecea lapagei</i> JCM 1684	90

[0023] (Example 3) It replaced with the pyrophosphoric acid in reaction mixture using the strain suspension prepared in Example 1, and was made to react to inosine using Tripoli phosphoric acid (reagent) or the "polygon P" [a trade name, polyphosphoric acid, and Chiyoda Chemicals products]. The generated amount of 5'-inosinic acid was shown in Table 3.

[0024]

[Table 3]

菌 株	イノシン酸生成量 mg/dl	
	試薬	「おろしP」
<i>Escherichia blattae</i> JCM 1650	358	698
<i>Serratia ficaria</i> ATCC 33105	190	387
<i>Klebsiella pneumoniae</i> IFO 3318	368	703
<i>Morganella morganii</i> IFO 3168	339	651
<i>Enterobacter aerogenes</i> IFO 12010	296	595
<i>Chromobacterium fluvitile</i> IAM 13652	330	655
<i>Cedecea lapagei</i> JCM 1684	295	605

[0025](Example 4) The reaction mixture which contains inosine 1 g/dL, specific pyrophosphate 5 g/dL, and magnesium sulfate 2mM in the buffer liquid of pH 3-8 was prepared using the biomass suspension prepared in Example 1, and it reacted at 30 \*\* among this reaction mixture for 1 hour. As shown in drawing 1, *Escherichia blattae* used for the reaction. JCM 1650 and *Serratia ficaria*. ATCC 33105 and *Klebsiella pneumoniae* IFO 3318, *Morganella morganii* IFO 3168, *Enterobacter aerogenes* IFO 12010, and *Chromobacterium fluvitile*. any of each strain of IAM 13652 and *Cedecea lapagei* JCM 1684 -- although -- in pH 5.0 to 5.5 range, 5'-inosinic acid was generated most efficiently.

[0026](Example 5) The reaction mixture which contains 1g of inosine / dL, specific pyrophosphate 5 g/dL, and magnesium sulfate 2mM in the acetic acid buffer liquid of pH 5.0 was prepared using the biomass suspension prepared in Example 1, and it reacted in 15-60 \*\* among this reaction mixture. As shown in drawing 2, *Escherichia blattae* used for the reaction. JCM 1650, *Klebsiella pneumoniae* IFO 3318, *Morganella morganii* IFO 3168, and *Enterobacter aerogenes* IFO 12010, any of each strain of *Chromobacterium fluvitile* IAM 13652 and *Cedecea lapagei* JCM 1684 -- although -- in the range which is 30-40 \*\*. *Serratia ficaria* ATCC 33105 is 5' most efficiently in near 55 \*\* of \*\*. - inosinic acid was generated.

[0027](Example 6) It replaced with the inosine in reaction mixture using the strain prepared in Example 1, and reacted similarly considering the uridine or the cytidine as a phosphate donor using phenyl phosphoric acid disodium. Generated 5'-uridine acidity or the amount of 5'-cytidylic acid was shown in Table 4.

[0028]

[Table 4]

菌 株	ウリジル酸 mg/dl	シチジル酸 mg/dl
<i>Escherichia blattae</i> JCM 1650	430	240
<i>Serratia ficaria</i> ATCC 33105	215	180
<i>Klebsiella planticola</i> IFO 14939	488	290
<i>Klebsiella pneumoniae</i> IFO 3318	420	380
<i>Klebsiella terrigena</i> IFO 14941	230	130
<i>Morganella morganii</i> IFO 3168	360	300
<i>Enterobacter aerogenes</i> IFO 12010	280	220
<i>Enterobacter aerogenes</i> IFO 13534	310	180
<i>Chromobacterium fluvitile</i> IAM 13652	285	160
<i>Cedecea lapagei</i> JCM 1684	150	130

[0029](Example 7) It replaced with the inosine in reaction mixture using the strain prepared in Example 1, and reacted similarly considering the uridine or the cytidine as a phosphate donor using carbamyl phosphate disodium. Generated 5'-uridine acidity or the amount of 5'-cytidylic acid was shown in Table 5.

[0030]

[Table 5]

菌 株	ウリジル酸 mg/dl	シチル酸 mg/dl
<i>Escherichia blattae</i> JCM 1650	425	245
<i>Serratia ficaria</i> ATCC 33105	220	185
<i>Klebsiella planticola</i> IFO 14939	495	295
<i>Klebsiella pneumoniae</i> IFO 3318	410	370
<i>Klebsiella terrigena</i> IFO 14941	235	195
<i>Morganella morganii</i> IFO 3168	380	320
<i>Enterobacter aerogenes</i> IFO 12010	285	225
<i>Enterobacter aerogenes</i> IFO 13534	325	200
<i>Chromobacterium fluvitile</i> IAM 13652	290	165
<i>Cedecea lapagei</i> JCM 1684	155	135

[0031]

[Effect of the Invention] To the phosphate donor chosen from the group which consists of a nucleoside and polyphosphoric acid (salt), phenyl phosphoric acid (salt), and carbamyl phosphate (salt). The method of this invention which the microorganism which has the capability to generate nucleoside 5'-phosphoric ester is made to act, and acquires nucleoside 5'-phosphoric ester, It has stability and the effect that nucleoside 5'-phosphoric ester is generated efficiently and it can extract, without being accompanied by the byproduction of an isomer.

[Translation done.]

\* NOTICES \*

JPO and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.\*\*\* shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

DESCRIPTION OF DRAWINGS

[Brief Description of the Drawings]

[Drawing 1]It is a diagram showing the relation between reaction pH and the generated amount of 5'-inosinic acid.

[Drawing 2]It is a diagram showing the relation between reaction temperature and the generated amount of 5'-inosinic acid.

[Translation done.]



## \* NOTICES \*

JPO and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

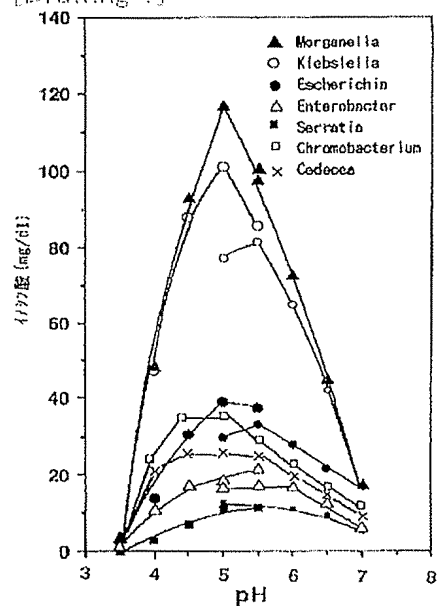
1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.

2.\*\*\*\* shows the word which can not be translated.

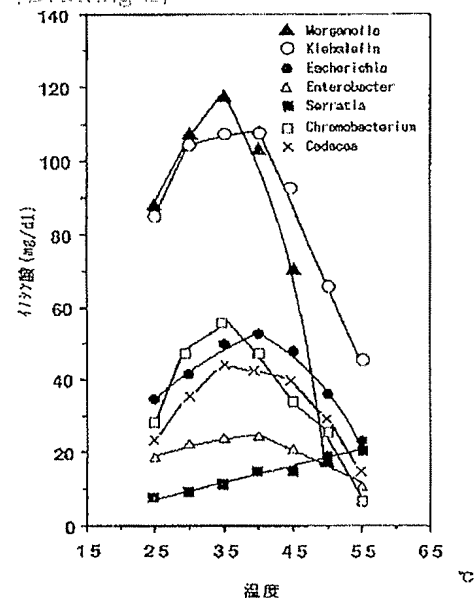
3.In the drawings, any words are not translated.

## DRAWINGS

[Drawing 1]



[Drawing 2]



[Translation done.]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-231793

(43) 公開日 平成7年(1995)9月5日

(51) Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 P 19/32		Z 7432-4B		
// (C 1 2 P 19/32				
C 1 2 R 1:185)				
(C 1 2 P 19/32				
C 1 2 R 1:425)				

審査請求 未請求 請求項の数 1 F D (全 6 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平6-315996	(71) 出願人	000000066 味の素株式会社 東京都中央区京橋1丁目15番1号
(22) 出願日	平成6年(1994)11月28日	(72) 発明者	山田 秀明 京都府京都市左京区松ヶ崎木の本町19-1
(31) 優先権主張番号	特願平5-348842	(72) 発明者	浅野 泰久 富山県射水郡小杉町太閤山9-3-1-321
(32) 優先日	平5(1993)12月27日	(72) 発明者	三原 康博 富山県射水郡小杉町三ヶ1289
(33) 優先権主張国	日本 (J P)	(72) 発明者	宇多川 隆 神奈川県横浜市鶴見区馬場5-10-17-305
		(74) 代理人	弁理士 佐藤 正年 (外1名)

(54) 【発明の名称】 ヌクレオシド-5'-リン酸エステルの製造法

(57) 【要約】

【目的】 微生物を用いて、異性体の副生を伴うことなく、安定かつ効率的に、ヌクレオシド-5'-リン酸エステルを製造する方法を提供する。

【構成】 エンテロバクター属、エシェリヒア属、モルガネラ属、クレブシエラ属、セラチア属、クロモバクテリウム属またはセデシア属に属し、ヌクレオシドならびにポリリン酸(塩)、フェニルリン酸(塩)およびカルバミルリン酸(塩)からなる群から選択されるリン酸供与体からヌクレオシド-5'-リン酸エステルを生成する能力を有する微生物を、pH4.0~6.5でヌクレオシドならびにポリリン酸(塩)、フェニルリン酸(塩)およびカルバミルリン酸(塩)からなる群から選択されるリン酸供与体に作用せしめ、生成するヌクレオシド-5'-リン酸エステルを採取する。

## 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 エンテロバクター属、エシェリヒア属、モルガネラ属、クレブシエラ属、セラチア属、クロモバクテリウム属又はセデシア属に属し、ヌクレオシドならびにポリリン酸（塩）、フェニルリン酸（塩）及びカルバミルリン酸（塩）よりなる群より選択されたリン酸供与体よりヌクレオシド-5'-リン酸エステルを生成する能力を有する微生物を、pH 4.0～6.5 の条件下でヌクレオシドならびにポリリン酸（塩）、フェニルリン酸（塩）およびカルバミルリン酸（塩）よりなる群より選択されたリン酸供与体に作用させてヌクレオシド-5'-リン酸エステルを生成せしめ、これを採取することを特徴とするヌクレオシド-5'-リン酸エステルの製造法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】この発明はヌクレオシド-5'-リン酸エステルの製造法に関する。ヌクレオシド-5'-リン酸エステルは、調味料、医薬ならびにそれらの原料として有用である。

## 【0002】

【従来の技術】ヌクレオシド-5'-リン酸エステルの生化学的な製造法としては、リン酸供与体としてパラニトロフェニルリン酸を用い、ヌクレオシドをリン酸化する方法（特公昭 39-29858 号）、無機リン酸を用いる方法（特公昭 42-1186 号）、アセチルリン酸を用いる方法（特開昭 56-82098 号）、アデノシン三リン酸（ATP）を使用する方法（特開昭 63-230094 号）が知られている。また、本発明者らは、ポリリン酸を用いる方法を開発している（特開昭 53-56390 号）。

## 【0003】

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、これらの方法にあつては使用する基質が高価であつたり、不安定であつたりして、安定したヌクレオシド-5'-リン酸エステルの生産を行うためには、不利であつた。また、本発明者らが開発してきたポリリン酸を用いる方法も、その後の詳細な検討の結果、生成物としてヌクレオシド-5'-リン酸エステルのみならず、2'-、3'-ヌクレオチド異性体を副生することが判明し、実用に供するには困難であることが明らかになった。

## 【0004】

【課題を解決するための手段】そこで本発明者は、安定したヌクレオシド-5'-リン酸エステルの生産を行うために種々の検討を加えた結果、ヌクレオシドならびにポリリン酸（塩）、フェニルリン酸（塩）およびカルバミルリン酸（塩）よりなる群より選択されたリン酸供与体に、弱酸性条件下（pH 4.0～6.5）にて特定の微生物を作用させることにより、2'-、3'-ヌクレオチドの副生を伴うことなく、効率的にヌクレオシド-5'-リン酸エステルを生産可能なることを発見し、本発明を完成す

るに至つた。

【0005】すなわち、本発明は、エンテロバクター属、エシェリヒア属、モルガネラ属、クレブシエラ属、セラチア属、クロモバクテリウム属又はセデシア属に属し、ヌクレオシドならびにポリリン酸（塩）、フェニルリン酸（塩）およびカルバミルリン酸（塩）よりなる群より選択されたリン酸供与体よりヌクレオシド-5'-リン酸エステルを生成する能力を有する微生物を、pH 4.0～6.5 の条件下でヌクレオシドならびにポリリン酸（塩）、フェニルリン酸（塩）およびカルバミルリン酸（塩）よりなる群より選択されたリン酸供与体に作用させて、ヌクレオシド-5'-リン酸エステルを生成せしめ、これを採取することを特徴とするヌクレオシド-5'-リン酸エステルの製造法を提供するものである。

## 【0006】

【作用】本発明において使用される微生物は、エンテロバクター属、エシェリヒア属、モルガネラ属、クレブシエラ属、セラチア属、クロモバクテリウム属またはセデシア属に属し、ヌクレオシドならびにポリリン酸（塩）、フェニルリン酸（塩）およびカルバミルリン酸（塩）よりなる群より選択されたリン酸供与体からヌクレオシド-5'-リン酸エステルを生成する能力を有する微生物であり、例えば、次のような微生物が使用される。

## 【0007】

*Escherichia blattae* JCM 1650  
*Serratia ficaria* ATCC 33105  
*Klebsiella planticola* IF0 14939 (ATCC 33531)  
*Klebsiella pneumoniae* IF0 3318 (ATCC 8724)  
*Klebsiella terrigena* IF0 14941 (ATCC 33257)  
*Morganella morganii* IF0 3168  
*Enterobacter aerogenes* IF0 12010  
*Enterobacter aerogenes* IF0 13534 (ATCC 13048)  
*Chromobacterium fluviatile* IAM 13652  
*Chromobacterium violaceum* IF0 12614  
*Cedecea lapagei* JCM 1684  
*Cedecea davisiae* JCM 1685  
*Cedecea neteri* JCM 5909

【0008】上記の微生物は、炭素源、窒素源、無機イオン等を含む通常の栄養培地中に培養される。炭素源としては、グルコース、フラクトース、シュクロース、マルトースなどの糖類の他、クエン酸、フマル酸、グルコン酸などの有機酸、エタノール、グリセリンなどのアルコール類が使用される。窒素源としては、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、硝酸アンモニウムなどのアンモニウム塩、アンモニア水、アンモニアガスが好適である。無機イオンとしては、例えば第一鉄イオン、マグネシウムイオン、マンガンイオン、リン酸イオン、カリウムイオンが、必要に応じて、添加される。さらに、必要に応じて、アミノ酸、ビタミン等またはこれらを含む酵母エキス、ペプトン、肉エキス、コーンステープリ

カー、大豆蛋白加水分解物等の有機栄養源が添加される。

【0009】上記の微生物の培養は、常法によって行われる。例えば、培地のpHを5～8とし、微生物を接種後、20～40℃にて5～72時間、好氣的に培養すればよい。

【0010】上記の微生物を、ヌクレオシドならびにポリリン酸（塩）、フェニルリン酸（塩）およびカルバミルリン酸（塩）よりなる群より選択されたリン酸供与体に作用せしめヌクレオシド-5'-リン酸エステルを得る方法としては、かくして得られた培養液、培養液から分離した微生物菌体、その乾燥菌体、菌体破砕物或いはその自己消化物などの菌体処理物を、水性媒体中にて、ヌクレオシドとポリリン酸（塩）、フェニルリン酸（塩）およびカルバミルリン酸（塩）よりなる群より選択されたリン酸供与体とを接触させればよい。この際、反応のpHを4.0～6.5の範囲の弱酸性に調整することが必要である。

【0011】リン酸供与体として用いられるポリリン酸（塩）としては、ピロリン酸、トリポリリン酸、トリメタリン酸、テトラメタリン酸、ヘキサメタリン酸、又はそれらの混合物もしくはそれらのナトリウム塩、カリウム塩、あるいはそれらの塩混合物などが、フェニルリン酸（塩）としては、フェニルリン酸ジナトリウム、フェニルリン酸ジカリウム、O,O'-ジフェニルリン酸無水物、又はそれらの混合物などが、カルバミルリン酸（塩）としては、カルバミルリン酸ジナトリウム、カルバミルリン酸ジカリウム、カルバミルリン酸ジアンモニウム、カルバミルリン酸ジリチウム、又はそれらの混合物などが使用可能である。リン酸供与体の使用濃度は、リン酸受容体であるヌクレオシドの濃度によって決定される。通常、ヌクレオシドの1～5倍量の添加が望ましい。

【0012】使用するヌクレオシドとしては、プリンヌクレオシド類として、プリンリボシド、イノシン、グアノシン、アデノシン、キサントシン等、ピリミジンヌクレオシド類として、ウリジン、シトシン等が挙げられる。使用するヌクレオシドに対応して、5'-プリンリボチド、5'-イノシン酸、5'-グアニル酸、5'-アデニル酸、5'-キサントシル酸、5'-ウリジル酸、5'-シチジル酸などが生成する。

【0013】反応液に添加するヌクレオシドの濃度としては、0.1～10g/dLが望ましいが、水に難溶性のヌクレオシドを使用する場合には、硼酸あるいはジメチルスルフォキシドなどの溶解助剤を添加するとよい。

【0014】反応は、通常、温度20～60℃、望まし

くは30～40℃で、pH4.0～6.5、望ましくはpH4.5～6.0の弱酸性側が好結果を与える。この適当なpH範囲は、従来、報告されているヌクレオシド-5'-リン酸エステルの生産方法におけるpHとは異なる範囲であって、この点にも本発明の特徴がある。

【0015】反応には、静置あるいは攪拌の何れの方法をも採用し得る。反応時間は、使用する微生物の活性、基質の濃度などの条件によって異なるが、1～100時間が望ましい。

【0016】反応液中に生成したヌクレオシド-5'-リン酸エステルの分離は、通常のイオン交換樹脂を用いる方法や、その他の通常に行われる分離方法が用いられる。

【0017】

【実施例】以下、本発明の実施例を詳細に説明する。なお、本実施例において、原料のヌクレオシドおよび生成したヌクレオシド-5'-リン酸エステルは、高速液体カラムクロマトグラフ法（HPLC、High Performance Liquid Chromatography）により、下記の機器および条件下に分析した。

カラム：コスモジル5C<sub>18</sub>-AR（4.6×150mm）[ナカライテスク社製品]

移動層：5mM Potassium phosphate（pH 2.8）：Methanol = 95:5

流速：1.0 mL/分

温度：室温

検出：UV 245nm

【0018】（実施例1）ペプトン1g/dL、酵母エキス0.5g/dL、食塩1g/dLを含有する栄養培地（pH7.0）を500mL容坂口フラスコに50mL入れ、120℃にて20分加熱殺菌した。これに、斜面培養した表1に示す微生物を接種し、30℃にて16時間培養した。かくして得られた培養液より遠心分離によって菌体を回収し、菌体を酢酸バッファー液（pH5.0）に懸濁し、菌体懸濁液を調製した。

【0019】イノシン2g/dL、ピロリン酸10g/dL、MgSO<sub>4</sub> 2mMを、酢酸バッファー液に溶解し、これに上記の菌体懸濁液を菌体湿重量で5g/dLとなるように添加し、pHを5.0に調整、維持しながら、30℃で5時間反応させた。生成した5'-イノシン酸量を表1に示した。なお、何れの菌株についても、2'-イノシン酸、3'-イノシン酸の副生は、ほとんど認められなかった。

【0020】

【表1】

菌 株	イノシン酸生成量 mg/dl
<i>Escherichia blattae</i> JCM 1650	304
<i>Serratia ficaria</i> ATCC 33105	153
<i>Klebsiella planticola</i> IFO 14939	412
<i>Klebsiella pneumoniae</i> IFO 3318	361
<i>Klebsiella terrigena</i> IFO 14941	167
<i>Morganella morganii</i> IFO 3168	190
<i>Enterobacter aerogenes</i> IFO 12010	211
<i>Enterobacter aerogenes</i> IFO 13534	219
<i>Chromobacterium fluvitile</i> IAM 13652	150
<i>Cedecea lapagei</i> JCM 1684	165

【0021】（実施例2）実施例1で調製した菌株を用い、反応液中のイノシンに代えて、グアニンを使用し、同様に反応を行った。生成した5'-グアニル酸量を

表2に示した。

【0022】

【表2】

菌 株	グアニル酸生成量 mg/dl
<i>Escherichia blattae</i> JCM 1650	203
<i>Serratia ficaria</i> ATCC 33105	120
<i>Klebsiella pneumoniae</i> IFO 3318	222
<i>Morganella morganii</i> IFO 3168	176
<i>Enterobacter aerogenes</i> IFO 12010	109
<i>Chromobacterium fluvitile</i> IAM 13652	110
<i>Cedecea lapagei</i> JCM 1684	90

【0023】（実施例3）実施例1で調製した菌株懸濁液を用い、反応液中のピロリン酸に代えて、トリポリリン酸（試薬）または「ポリゴンP」〔商品名、ポリリン酸、千代田化学（株）製品〕を用い、イノシンと反応させた。

生成した5'-イノシン酸量を表3に示した。

【0024】

【表3】

菌 株	イノシン酸生成量 mg/dl	
	試薬	「ポリゴンP」
<i>Escherichia blattae</i> JCM 1650	358	698
<i>Serratia ficaria</i> ATCC 33105	190	387
<i>Klebsiella pneumoniae</i> IFO 3318	368	703
<i>Morganella morganii</i> IFO 3168	339	651
<i>Enterobacter aerogenes</i> IFO 12010	296	595
<i>Chromobacterium fluvitile</i> IAM 13652	330	655
<i>Cedecea lapagei</i> JCM 1684	295	605

【0025】（実施例4）実施例1で調製した菌体懸濁液を用い、pH3～8のバッファー液中で、イノシン1g/dL、ピロリン酸ナトリウム5g/dL、硫酸マグネシウム2mMを含む反応液を調製し、この反応液中、30℃で1時間反応した。図1に示す如く、反応に使用した*Escherichia blattae* JCM 1650、*Serratia ficaria* ATCC 33105、*Klebsiella pneumoniae* IFO 3318、*Morganella morganii* IFO 3168、*Enterobacter aerogenes* IFO 12010、*Chromobacterium fluvitile* IAM 13652、*Cedecea lapagei* JCM 1684の各菌株の何れもが、pH5.0～5.5の範囲において、最も効率的に5'-イノシン酸を生成した。

【0026】（実施例5）実施例1にて調製した菌体懸濁液を用い、pH5.0の酢酸バッファー液中でイノシン1g/dL、ピロリン酸ナトリウム5g/dL、硫酸マグネシウム2mMを含む反応液を調製し、この反応液

中、15～60℃において反応を行った。図2に示す如く、反応に使用した*Escherichia blattae* JCM 1650、*Klebsiella pneumoniae* IFO 3318、*Morganella morganii* IFO 3168、*Enterobacter aerogenes* IFO 12010、*Chromobacterium fluvitile* IAM 13652、*Cedecea lapagei* JCM 1684の各菌株の何れもが30～40℃の範囲で、*Serratia ficaria* ATCC 33105 はは55℃付近において、最も効率的に5'-イノシン酸を生成した。

【0027】（実施例6）実施例1で調製した菌株を用い、反応液中のイノシンに代えて、ウリジンまたはシチジンを、燐酸供与体としてフェニル燐酸ジナトリウムを使用して同様に反応を行った。生成した5'-ウリジル酸量または5'-シチジル酸量を表4に示した。

【0028】

【表4】

菌 株	ウリジン酸 mg/dl	シチジル酸 mg/dl
<i>Escherichia blattae</i> JCM 1650	430	240
<i>Serratia ficaria</i> ATCC 33105	215	180
<i>Klebsiella planticola</i> IFO 14939	488	290
<i>Klebsiella pneumoniae</i> IFO 3318	420	380
<i>Klebsiella terrigena</i> IFO 14941	230	130
<i>Morganella morganii</i> IFO 3168	360	300
<i>Enterobacter aerogenes</i> IFO 12010	280	220
<i>Enterobacter aerogenes</i> IFO 13534	310	180
<i>Chromobacterium fluvitile</i> IAM 13652	285	160
<i>Cedecea lapagei</i> JCM 1684	150	130

【0029】（実施例7）実施例1で調製した菌株を用い、反応液中のイノシンに代えて、ウリジンまたはシチジンを、磷酸供与体としてカルバミル磷酸ジナトリウムを使用して同様に反応を行った。生成した5'-ウリジ

ル酸量または5'-シチジル酸量を表5に示した。

【0030】

【表5】

菌 株	ウリジン酸 mg/dl	シチジル酸 mg/dl
<i>Escherichia blattae</i> JCM 1650	425	245
<i>Serratia ficaria</i> ATCC 33105	220	185
<i>Klebsiella planticola</i> IFO 14939	495	295
<i>Klebsiella pneumoniae</i> IFO 3318	410	370
<i>Klebsiella terrigena</i> IFO 14941	235	135
<i>Morganella morganii</i> IFO 3168	380	320
<i>Enterobacter aerogenes</i> IFO 12010	285	225
<i>Enterobacter aerogenes</i> IFO 13534	325	200
<i>Chromobacterium fluvitile</i> IAM 13652	290	165
<i>Cedecea lapagei</i> JCM 1684	155	135

【0031】

【発明の効果】ヌクレオシドならびにポリ磷酸（塩）、フェニル磷酸（塩）およびカルバミル磷酸（塩）よりなる群より選択された磷酸供与体に、ヌクレオシド-5'-磷酸エステルを生成する能力を有する微生物を作用せしめ、ヌクレオシド-5'-磷酸エステルを取得する本発明の方法は、異性体の副生を伴うことなく、安定、か

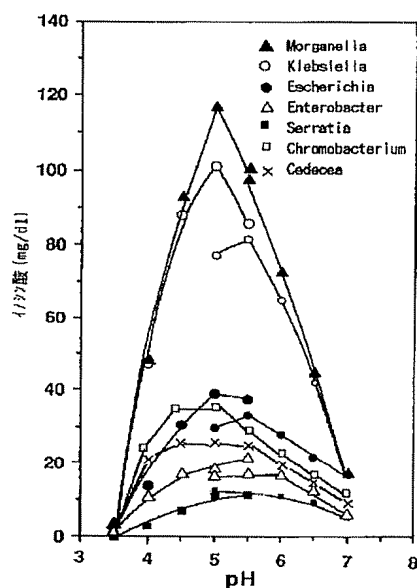
つ、効率よくヌクレオシド-5'-磷酸エステルを生成し、採取し得るという効果を有する。

【図面の簡単な説明】

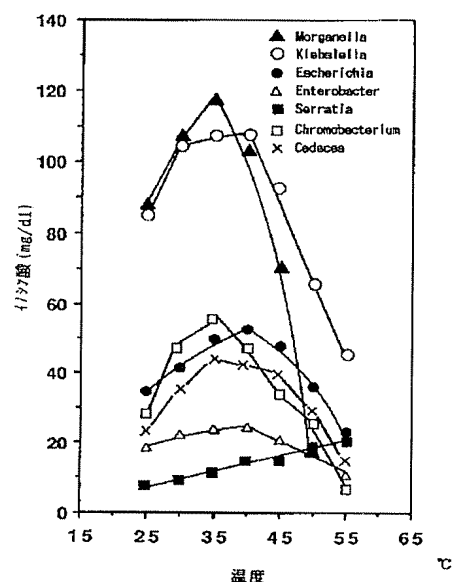
【図1】反応pHと5'-イノシン酸の生成量との関係を示す線図である。

【図2】反応温度と5'-イノシン酸の生成量との関係を示す線図である。

【図1】



【図2】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. 6

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

(C 1 2 P 19/32

C 1 2 R 1:22)

(C 1 2 P 19/32

C 1 2 R 1:01)